

**Method for the immunological determination of ligands.**

Patent Number: ☐ EP0444561, A3, B1  
Publication date: 1991-09-04  
Inventor(s): DEGER ARNO DR (DE); SCHENK ROLAND DR (DE); BIENHAUS GERHARD DR (DE)  
Applicant(s):: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)  
Requested Patent: ☐ JP4216465  
Application Number: EP19910102712 19910225  
Priority Number (s): DE19904006054 19900226  
IPC Classification: C12Q1/68 ; G01N33/53 ; G01N33/543 ; G01N33/563 ; G01N33/58  
EC Classification: G01N33/53, G01N33/543B, G01N33/563, G01N33/58, G01N33/78  
Equivalents: AU647449, AU7101391, CA2034922, ☐ DE4006054, ES2096596T, JP2501960B2, KR9408091, ZA9101343

---

**Abstract**

---

Method for the immunological determination of a ligand, in which the ligand to be determined is reacted with a) at least 2 molecules of a substance P2 which is capable of specific binding, with at least one of these molecules carrying a label, and b) a receptor R which consists of a binding partner P1 which is capable of monovalent binding with P2, and of a binding site R1 for the ligand to be determined, and then the label is determined, and a reagent for the immunological determination of a ligand, which contains a substance P2 which is capable of specific binding and is at least partially in labelled form, and a receptor R which consists of a binding partner P1 which is capable of monovalent binding with P2 and of a binding site R1 for the ligand to be determined.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

## Claims

1. Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Liganden, dadurch gekennzeichnet, dass man den zu bestimmenden Liganden mit

- a) mindestens 2 Molekülen einer spezifisch bindefähigen Substanz P2, von denen mindestens eines dieser Moleküle eine Markierung trägt und
- b) einem Rezeptor R, der aus einem für P2 monovalent bindefähigen Bindungspartner P1 und einer Bindungsstelle R1 für den zu bestimmenden Liganden besteht, umsetzt und dann die Markierung bestimmt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man in heterogener Phase arbeitet und hierzu ein Molekül P2, das an eine feste Phase gebunden und nicht markiert ist, verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man in homogener Phase arbeitet und alle Moleküle P2 in markierter Form einsetzt.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man zusätzlich ein Konjugat K aus Ligand oder Ligand-Analog und P1 bei der Inkubation zusetzt.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass P1 Biotin, ein Hapten oder ein Epitop ist.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass P2 Avidin, Streptavidin, ein Polymeres derselben oder ein Antikörper oder Antikörperfragment ist.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass R1 ein Hapten, ein Epitop, eine DNA- oder RNA-Sequenz oder ein Makromolekül ist.

8. Reagenz zur immunologischen Bestimmung eines Liganden, dadurch gekennzeichnet, dass es eine spezifisch bindefähige Substanz P2, die mindestens teilweise in markierter Form vorliegt, und einen Rezeptor R, der aus einem für P2 monovalent bindefähigen Bindungspartner P1 und einer Bindungsstelle R1 für den zu bestimmenden Liganden besteht, enthält.

9. Reagenz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es unmarkiertes, an eine Festphase gebundenes oder mit einer Festphase bindefähiges P2 enthält.

10. Reagenz nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich ein Konjugat K aus Ligand oder Ligand-Analog und P1 enthält.

## D scription

Die Erfindung betrifft ein immunologisches Verfahren zur Bestimmung eines Liganden sowie eine dazu geeignete Reagenzien-Zusammensetzung.

In Körperflüssigkeiten und Geweben kommen sehr viele Substanzen vor, die mit einem spezifischen Bindungspartner bindefähig sind und als Parameter für bestimmte Erkrankungen oder den Gesundheitszustand des menschlichen Körpers dienen. Hierzu zählen einerseits immunologisch aktive Proteine, die Bindungsstellen an ihrer Oberfläche aufweisen wie z.B. Tumormarker, Hormone oder virale Proteine und andererseits DNA-Fragmente. Da diese nachfolgend als "Ligand" bezeichneten Substanzen oft nur in sehr geringen Mengen vorkommen, verwendet man zu ihrem Nachweis Verfahren nach dem Prinzip des Immunoassays, mit denen diese Substanzen sehr spezifisch und genau bestimmt werden können. Die bekannten immunologischen Bestimmungsverfahren lassen sich in homogene und heterogene Verfahren einteilen. Bei den heterogenen Verfahren ist immer eine Festphasen-Reaktion beteiligt, um Komplexe, die die nachzuweisende Substanz und eine markierte Komponente enthalten, zu immobilisieren und dadurch von ungebundenen Komponenten abzutrennen. Bei den homogenen Verfahren erfolgt keine Trennung von gebundener Markierung und ungebundener Markierung, so dass eine Differenzierung von gebundener und ungebundener Markierung durch andere Methoden erfolgen muss.

Die heterogenen Immunoassays basieren im wesentlichen auf zwei Varianten, nämlich kompetitiven und Sandwich-Assays. Bei diesen Verfahrensvarianten werden in der Regel mindestens zwei Rezeptoren eingesetzt, die mit dem nachzuweisenden Liganden bindefähig sind und von denen einer eine Markierung trägt und der andere an eine Festphase gebunden ist oder die Bindung an eine feste Phase vermittelt. Eine Vielzahl von Varianten sind hierzu bekannt unter Verwendung weiterer Rezeptoren. In die Bestimmung gehen nun alle Komplexe ein, die an der Festphase gebunden sind und eine Markierung aufweisen.

Zur Durchführung von kompetitiven heterogenen Immunoassays gibt es im wesentlichen zwei Varianten, wobei entweder ein Antikörper gegen den Liganden immobilisiert wird oder eine zum Liganden analoge Substanz immobilisiert wird. In der ersten Variante wird eine Probelösung, die den Liganden enthält und ein Konjugat aus Ligand und einer Markierung mit dem immobilisierten Antikörper inkubiert. Dabei konkurrieren Ligand und markierte Substanz um die Bindung an den Antikörper. Je mehr Ligand in der Lösung vorhanden ist, desto weniger markierte Substanz kann gebunden werden. Nach der Trennung von fester und flüssiger Phase kann dann die Markierung in einer der beiden Phasen bestimmt werden. Die Menge an gebundener markierter Substanz ist ein indirektes Mass für die Menge an zu bestimmender Substanz, also an Ligand.

In der zweiten Variante wird die Probelösung, die den Ligand enthält, mit einem für sie spezifischen Antikörper sowie dem immobilisierten Substanz-Analogen inkubiert. Hierbei konkurrieren immobilisierter Ligand und in der Lösung vorhandener Ligand um die Bindung an den Antikörper. Je mehr Ligand in der Lösung vorhanden ist, desto weniger Antikörper wird durch Bindung an den immobilisierten Ligand analog an die Festphase gebunden. Auch hier wird wiederum nach Trennung der festen Phase von der flüssigen Phase die Menge an gebundener Markierung bestimmt, die wieder indirekt proportional zur Menge an Ligand in der Probelösung ist.

Bei den Varianten des Sandwich-Immunoassays wird ein Antikörper gegen den Ligand immobilisiert und die Probelösung in Gegenwart dieses immobilisierten Antikörpers mit einem weiteren Antikörper, der mit dem Ligand bindefähig ist und markiert ist, inkubiert. Die Rezeptoren werden dabei im Überschuss zugegeben, so dass alle in der Probe befindlichen nachzuweisenden Moleküle an der Festphase gebunden werden und mit einem markierten Rezeptor binden.

Ein Nachteil dieser Verfahren ist es, dass für jede zu bestimmende Substanz (Ligand) mehrere speziell angepasste Rezeptoren vorgesehen werden müssen. So sind häufig markierte spezielle Antikörper erforderlich, die von Ligand zu Ligand verschieden sind. Die kovalente Bindung von Markierungsgruppen an Antikörper, die üblicherweise an mehreren Stellen des Antikörpermoleküls angreift, kann unerwünschte Veränderungen der Bindeeigenschaften des so modifizierten Antikörpers hervorrufen.

Ein weiteres Problem tritt auf beim Nachweis von Proteinen oder DNA- oder RNA-Fragmenten, die mehr als eine Bindungsstelle aufweisen.

Hier kann jeweils eine Mehrzahl oder Vielzahl von Rezeptoren binden, wobei die daraus resultierende Ungenauigkeit durch Einsatz von Standards noch zu kompensieren ist. Diese Ungenauigkeit wird jedoch noch potenziert, wenn alle eingesetzten Rezeptoren selbst wieder bi- oder polyvalent sind.

Es war daher Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem Liganden mit hoher Genauigkeit, guter Reproduzierbarkeit und hoher Spezifität nachgewiesen werden können und bei dem ausserdem universell einsetzbare, markierte Komponenten und universell geeignete Festphasenmaterialien verwendet werden können. Insbesondere soll nur ein einziger speziell angepasster Rezeptor erforderlich sein.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Liganden, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man den zu bestimmenden Liganden mit

- a) mindestens 2 Molekülen einer spezifisch bindefähigen Substanz P2, von denen mindestens eines dieser Moleküle eine Markierung trägt und
- b) einem Rezeptor R, der aus einem für P2 monovalent bindefähigen Bindungspartner P1 und einer Bindungsstelle R1 für den zu bestimmenden Liganden besteht, umsetzt und dann die Markierung bestimmt.

Gemäss Merkmal a) wird markiertes P2 in bekannter Menge bevorzugt im Überschuss bezüglich der möglichen Menge an Ligand eingesetzt, wobei dieser Überschuss, wenn alles P2 markiert ist, auf die doppelte stöchiometrische Menge an Ligand bezogen ist, wenn auch unmarkiertes P2 eingesetzt wird, auf die einfache stöchiometrische Menge Ligand bezogen ist. Bei der letzteren Ausführungsform liegt auch unmarkiertes P2 im einfachen Überschuss vor.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist geeignet zur Bestimmung aller in Körperflüssigkeiten oder Gewebe-Extrakten nachzuweisenden, zu einer spezifischen Bindung befähigten Liganden, wobei niedrig konzentrierte Substanzen ebenso gut nachweisbar sind wie hoch konzentrierte. Die Empfindlichkeit und Genauigkeit des Verfahrens ist gegenüber den bisher bekannten Verfahren verbessert. Die Erfindung bietet die Möglichkeit, mit einfachen Reagenzien schnell und zuverlässig Bestimmungen durchzuführen.

Das Verfahren ist besonders geeignet zur Bestimmung von Liganden mit mehreren Bindungsstellen und von DNA- oder RNA-Molekülen. Unter spezifischer Bindungsstelle wird dabei eine Bindungsstelle verstanden, die eine spezifische Bindung mit einer anderen Substanz eingehen kann. Beispiele hierfür sind antigene Determinanten, spezifische Bindungsstellen auf Proteinen oder eine spezifische Nukleinsäure-Sequenz auf DNA oder RNA.

Wesentliches Merkmal ist, dass Rezeptor R einen einzigen Partner P1 des spezifisch bindenden Paares P1/P2 enthält und dieser Partner P1 gegenüber P2 monovalent ist, so dass nur ein einziges Molekül P2 pro Molekül Rezeptor R gebunden werden kann. Als Komponente R1 sind Substanzen geeignet, die mit dem Liganden spezifisch bindefähig sind. Dies können z.B. Makromoleküle wie Antikörper, Antikörper-Fragmente und spezifisch bindefähige Bindeproteine, Haptene, Epitope oder, im Falle eines DNA- oder RNA-Nachweises, DNA-Sonden sein. Bevorzugt weist die Komponente R1 nur eine Bindungsstelle für den Liganden auf. Im Falle eines Proteinnachweises werden bevorzugt Antikörper-Fragmente verwendet, die nur ein Paratop haben oder Substanzen, mit denen das Protein spezifisch eine Bindung eingeht, beispielsweise T4 zum Nachweis von T4 bindendem Protein. Für den Nachweis von DNA oder RNA wird als Komponente R1 z.B. eine Sonde verwendet, die mit einer Sequenz der nachzuweisenden DNA oder RNA hybridisieren kann. Besonders bevorzugt wird als Komponente R1 im Rezeptor R ein Fab'-Fragment eines mit dem Ligand bindefähigen Antikörpers verwendet. R1 kann abhängig vom Liganden eine einheitliche Substanz oder eine Mischung sein.

Die Komponente P1 des Rezeptors R ist ein Partner eines spezifisch bindenden Paares. Spezifisch miteinander bindende Paare sind bekannt. Geeignete Bindungspaare sind insbesondere Biotin-Streptavidin bzw. Avidin; Hapten-Antikörper, Antigen-Antikörper, Conavalin-Antikörper; Zucker-Lectin; Hapten-Bindeprotein, z.B. Thyroxin bindendes Globulin und Thyroxin- oder Oligopeptid-Antikörper.

Besonders bevorzugt wird als bindendes Paar Biotin und Streptavidin bzw. Avidin eingesetzt, so dass Rezeptor R1 besonders bevorzugt ein einziges Molekül Biotin als Partner P1 enthält.

Die Herstellung der Konjugate erfolgt unter Anwendung der dem Fachmann bekannten Methoden (z.B. analog Eur. J. Biochem. 131 (1980) 333-338).

Im Falle einer heterogenen Verfahrensführung vermittelt P2 in nicht markierter Form die Bindung an die

feste Phase. " "

Erfindungsgemäss wird erreicht, einen Universaltest zur Verfügung zu stellen, da feste Phase und Markierungskonjugat für alle Bestimmungen gleichbleiben können und nur ein einziger Rezeptor auf den jeweils nachzuweisenden Liganden abgestimmt werden muss. Da die Bindung von R, Ligand und markiertem P2 in homogener Phase abläuft, ist sie gegenüber der Bindung von R an die Festphasen P2, die in heterogener Phase abläuft, bevorzugt. Das an die Festphase gebundene nicht markierte P2 des spezifisch bindenden Systems wird daher im Überschuss verwendet.

Bevorzugt werden als Rezeptor R vorzugsweise Konjugate verwendet, die aus einem Antikörper oder Antikörper-Fragment R1 und Biotin als P1 bestehen.

Die Herstellung der Konjugate R erfolgt in an sich bekannter Weise durch Umsetzung der Komponente R1, z.B. eines Antikörpers bzw. Antikörperderivats mit dem Partner P1 im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. Vorzugsweise erfolgt die Kopplung über eine freie SH-Gruppe oder eine Aminogruppe. Die dabei statistisch entstehen-den Produkte mit zwei oder mehr Komponenten P1 können durch gelchromatographische Verfahren abgetrennt werden. Besonders bevorzugt werden für das erfindungsgemässe Verfahren Konjugate R eingesetzt, die aus einem Fab'-Fragment und Biotin bestehen. Zur Herstellung derartiger Konjugate wird z.B. ein mit dem nachzuweisenden Liganden bindefähiger Antikörper mit Pepsin behandelt, das entstehende F(ab')<sub>2</sub>-Fragment reduzierenden Bedingungen ausgesetzt und anschliessend mit der Komponente P1 umgesetzt, wobei entweder über eine in der Komponente P1 vorhandene funktionelle Gruppe oder über einen Spacer gegebenenfalls nach Aktivierung der Bindungsstellen die Komponente P1 an einer freien SH-Gruppe oder Aminogruppe des Fab'-Fragmentes bindet. Produkte, die einen oder mehrere Partner P1 enthalten, können beispielsweise nach einem in EP-A 0 131 343 beschriebenen Verfahren aufgetrennt werden, wobei die Ladungsdifferenz verwandter Proteine zur Auftrennung herangezogen wird. Bei Bindung des Partners über die Amino-Funktionen eines Proteins führt Einfach- oder Mehrfachbindung zu Konjugaten mit unterschiedlicher Ladung, was ihre Trennung ermöglicht.

Als feste Phase besonders geeignet sind Reagenzgläschen oder Mikrotiterplatten aus Polystyrol und ähnlichen Kunststoffen, die adsorptiv oder kovalent an der Innenoberfläche mit P2 beschichtet sind. Weiterhin geeignet sind auch teilchenförmige Substanzen, z.B. Molekularsiebmateriale, Glasperlen, Kunststoffschläuche und dergleichen sowie poröse schichtförmige Träger wie Papier. Die Bindung des Partners P2 erfolgt in an sich bekannter Weise.

Mindestens ein Teil von P2, bei homogener Testführung alles P2, wird in markierter Form eingesetzt. Als Markierung eignen sich dabei die üblichen Markierungen immunologischer Tests, z.B. ein Enzym, eine fluoreszierende, chemilumineszierende oder radioaktive Substanz. Verfahren zur Markierung sind dem Fachmann bekannt, z.B. aus Clin.Chim. Acta 81 (1977) 1-40 und bedürfen hier keiner weiteren Erläuterung. Die Markierung kann in an sich bekannter Weise bestimmt werden.

Wird die Erfindung mit homogener Verfahrensführung eingesetzt, d.h. ohne Verwendung einer festen Phase, so wird alles P2 in markierter Form verwendet. Die dabei gebildeten Komplexe aus Ligand, mindestens zwei Molekülen R und einer der Anzahl R im Komplex entsprechenden Anzahl von Molekülen P2 markiert wird dann nach den dem Fachmann bekannten Methoden zur Messung einer Markierung bei homogener Verfahrensführung nachgewiesen. Geeignete Nachweismethoden sind beispielsweise beschrieben in EP-B 0084 807.

Sowohl bei heterogener als auch bei homogener Führung des erfindungsgemässen Verfahrens kann zusätzlich ein Konjugat K eingesetzt werden, welches den Ligand oder ein Ligand-Analog mit einem Bindepartner P1 enthält, der mit dem Bindepartner P1 im Rezeptor R identisch ist. Bei dieser Verfahrensführung konkurrieren Ligand in der Probelösung mit Ligand oder Ligand-Analog im zugesetzten Konjugat K um die Komponente R1 im Rezeptor R, so dass sich ein kompetitives Verfahren ergibt. Diese Ausführungsform kann sowohl beim Festphasenverfahren als auch beim Verfahren in homogener Phase angewendet werden. Für die Herstellung des Konjugats K gelten die Ausführungen zur Herstellung des Rezeptors R in gleicher Weise. Als Ligand-Analog wird dabei eine Substanz angesehen, die hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit mit der Komponente R1 im Rezeptor R ähnliche Eigenschaften wie der Ligand selbst aufweist, so dass tatsächlich eine Konkurrenz um die Bindungsstelle unter den eingesetzten stöchiometrischen Bedingungen vorliegt.

Das Verfahren kann in einer oder mehr Stufen durchgeführt werden. Die Auswertung erfolgt in an sich bekannter Weise. Da jeder der Rezeptoren und auch die zu bestimmende Substanz jeweils nur spezifisch mit dem für ihn bestimmten Reaktionspartner reagieren kann, ist es möglich, alle Rezeptoren und die Probe zusammen zu inkubieren und das Verfahren einstufig durchzuführen. Dies ist besonders vorteilhaft bei der Durchführung des Verfahrens in einem Analyseautomaten. Für den Fall, dass das

Verfahren einstufig heterogen durchgeführt wird, wird vorzugsweise die Substanz P2, die eine Markierung trägt, im Überschuss gegen über dem Rezeptor R eingesetzt.

Die Durchführung aller Verfahrensvarianten erfolgt vorzugsweise in einer gepufferten Lösung. Puffersysteme für diese Verfahren sind an sich bekannt. Besonders geeignet sind hierfür GOOD-Puffer und Phosphatpuffer.

Zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens in heterogener Phase wird die Probelösung mit den drei Rezeptoren R, markiertes P2 und gegebenenfalls K in Gegenwart mit P2 unmarkiert beschichteten Festphase entweder gleichzeitig oder nacheinander inkubiert. Dabei binden beispielsweise zwei Rezeptoren R an den Liganden über die Komponenten R1. Über Partner P1 des einen Rezeptors R wird dann markierter P2 gebunden und über den anderen Rezeptor R erfolgt durch das Bindepaar P1/P2 unmarkiert die Bindung an die feste Phase. In die Auswertung gehen alle Komplexe ein, die an der Festphase gebunden sind und eine Markierung tragen.

Erfindungsgemäss wird ein Verfahren zur Verfügung gestellt, das einfach und schnell durchzuführen ist und auch bei Verwendung polyklonaler Antikörper sehr empfindlich ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Reagenz zur immunologischen Bestimmung eines Liganden, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es eine spezifisch bindefähige Substanz P2, die mindestens teilweise in markierter Form vorliegt, und einen Rezeptor R, der aus einem für P2 monovalent bindefähigen Bindungspartner P1 und einer Bindungsstelle R1 für den zu bestimmenden Liganden besteht, enthält. Vorzugsweise enthält das Reagenz die Substanz P2 in markierter Form und als festphasengebundene Form in vereinigter Konfektionierung (z.B. Schicht im Testträgerdevice oder magm. Partikellösung)

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform enthält dieses Reagenz unmarkiertes, an eine Festphase gebundenes oder mit einer Festphase bindefähiges P2. Gemäss einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält das Reagenz zusätzlich ein Konjugat K aus Ligand oder Ligand-Analog und einer Komponente P1 wie vorstehend definiert.

Dieses Reagenz ist zur Bestimmung einer Vielzahl von Parametern in Körperflüssigkeiten und Gewebeextrakten geeignet.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Reagenz zusätzlich Puffersubstanzen. Besonders bevorzugt enthält es Phosphatpuffer oder GOOD-Puffer.

Fig. 1 zeigt ein Diagramm, in dem die Ergebnisse für die Bestimmung des Thyroxin-Bindungsindex aufgetragen sind.

Fig. 2 zeigt ein Diagramm, in dem die Ergebnisse für die Bestimmung von Anti-T4-Antikörper aufgetragen sind.

Die Erfindung wird durch die Figur und die Beispiele erläutert.

#### Beispiel 1

##### Bestimmung von AFP ( alpha -Föto-Protein)

a) Herstellung eines Konjugats aus Biotin und Fab'-Fragmenten von Anti-AFP-Antikörpern (Anti-AFP-Fab'-Biotin)

Polyklonale Antikörper gegen AFP werden immunsorptiv aufgereinigt und hieraus Fab'-Fragmente hergestellt. Diese werden nach Analyt.Biochem. 161 (1987) 262-271 bzw. Analyt.Biochem. 149 (1985) 529-536 an Biotin gekoppelt.

b) Testdurchführung

Puffer A:

120 mmol/l Natriumbarbiturat

18,2 mmol/l Phosphatpuffer, pH 8,6

1,27 mmol/l 8-Anilino-1-naphtalinsulfonsäure

0,2 Gew.-% Rinderserumalbumin

(Endkonzentration im Test)

480 µl Puffer A und 20 µl Anti-AFP-Fab'-Biotin (Endkonzentration im Test: 4 µg/ml) werden in ein mit Streptavidin beschichtetes Polystyrolgefäß (Herstellung nach EP-A 0 269 092) zusammen mit 50 µl Probe (Humanserum aufgestockt mit AFP) gegeben und 30 Minuten bei 25 DEG C inkubiert. Anschliessend werden 480 µl Puffer A und 20 µl einer Lösung eines Streptavidin-POD-Konjugats (50 mU/ Test) zugegeben und 30 Minuten bei 25 DEG C inkubiert. Es wird gewaschen und 1 ml ABTS TM -Lösung (9,1 mmol/l ABTS TM , 2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonsäure(6)]-di-ammoniumsalz, 100 mmol/l Phosphat-Citrat-Puffer, pH 4,4, 3,2 mmol/l Natriumperborat) zugegeben, bei 25 DEG C 30 Minuten inkubiert und die optische Dichte bei 422 nm als Mass für den AFP-Gehalt bestimmt.

## Beispiel 2

### T-Uptake-Test

Die Bestimmung erfolgt in der Weise, dass T4 zur Probe zugegeben wird, um überschüssiges TBG abzusättigen. Danach wird das nicht gebundene T4 gemessen. Damit wird eine dem Thyroxinbindungsindex (TBI) direkt proportionale Eichkurve erhalten.

Probe: Als Proben werden Standards verwendet, die in Humanserum definierte Mengen TBG und T4 enthalten. Für Probe 1 ergibt sich ein TBI von 0,44 und für Probe 2 ein TBI von 1,44 (vgl. Arbeitsanleitung zu Enzymun-Test TM TBK von Boehringer Mannheim GmbH, Bestell-Nr. 249416).

#### Reagenz 1

100 U/l Konjugat aus Streptavidin und POD  
36 pmol/l T4  
120 mmol/l Natriumbarbiturat  
18,2 mmol/l Phosphatpuffer, pH 8,6  
0,2 Gew.-% Rinderserumalbumin

#### Reagenz 2

0,2 nmol/l Konjugat aus T4 und Biotin  
0,15 mg/l Anti-T4-Fab'-Biotin aus polyklonalen Antikörpern gegen T4 (entsprechend Beispiel 1 hergestellt)  
120 mmol/l Natriumbarbiturat  
18,2 mmol/l Phosphatpuffer, pH 8,6  
0,2 Gew.-% Rinderserumalbumin  
50 µl Probe werden mit 500 µl Reagenz 1 in ein mit Streptavidin beschichtetes Polystyrolgefäß gegeben und 30 Minuten bei 25 DEG C inkubiert. Es werden 500 µl Reagenz 2 zugegeben und 30 Minuten bei 25 DEG C inkubiert. Anschliessend wird mit Wasser gewaschen und 1 ml ABTS TM -Lösung (vgl. Beispiel 1) zugegeben, bei 25 DEG C 30 Minuten inkubiert und die optische Dichte bei 422 nm als Mass für den Thyroxinbindungsindex bestimmt. Die Ergebnisse sind aus Fig. 1 zu ersehen.

## Beispiel 3

### Bestimmung eines Antikörpers gegen T4

Als Probe werden Standardlösungen von polyklonalen Antikörpern gegen T4, mit den Konzentrationen 0, 0,5 und 1,0 mg/l verwendet.

Reagenz:

10 mmol/l T4-Biotin-Konjugat  
50 U/l Streptavidin-POD-Konjugat  
120 mmol/l Natriumbarbiturat  
18,2 mmol/l Phosphatpuffer, pH 8,6  
1,27 mmol/l 8-Anilino-1-Naphthalinsulfonsäure  
0,2 Gew.-% Rinderserumalbumin  
50 µl Probe und 1 ml Reagenz werden in einem mit Streptavidin beschichteten Polystyrolgefäß bei 25 DEG C 30 Minuten inkubiert. Anschliessend wird gewaschen und 1 ml ABTS TM -Lösung (vgl. Beispiel 1) zugegeben, bei 25 DEG C 30 Minuten inkubiert und die optische Dichte bei 422 nm als Mass für den Gehalt an Antikörpern gegen T4 bestimmt. Die Ergebnisse sind aus Figur 2 zu ersehen.

#### Beispiel 4

##### Herstellung von IgG-Biotin (1:1)

- 1) 50 mg eines monoklonalen Antikörpers gegen TSH (ECACC 87122202) wird mit 2-fachem molarem Überschuss an D-Biotinyl- $\alpha$ -amidocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester gem. JACS 100 (1978), 3585-3590 umgesetzt. Man erhält als Hauptprodukt monobiotinylierte IgG's und höherbiotinylierte Nebenprodukte, die abgetrennt werden.
- 2) Die Abtrennung erfolgt mittels DIP-Chromatographie (Delta-Isoelectric-Point) die z.B. in EP-A 0 131 343 beschrieben ist.

Die Trennung des Gemisches erfolgte auf einer Mono-S Kationenaustauschersäule (Pharmacia).

Das Gemisch wurde in 1 mmol/l Kaliumpyrophosphat-Puffer pH 6,9 (Puffer A) aufgegeben. Die gebundenen Komponenten wurden durch Anlegen eines linearen Gradienten mit 20 mmol/l Kaliumpyrophosphatpuffer/200 mmol/l NaCl, pH 6,9 (Puffer B) eluiert. Man erhält die reine monobiotinylierte IgG Fraktion in hoher Ausbeute, neben Pools mit höherem Biotinylierungsgrad.

#### Beispiel 5

##### Herstellung von Fab-Biotin (1:1)

- 1) Monoklonale Antikörper gegen TSH (ECACC 87122202) werden gem. A. Johnstone, R. Thorpe; Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications (1982), 52 -53, in Fab gespalten. 50 mg Fab werden wie in Beispiel 4 beschrieben umgesetzt.
- 2) Die Auftrennung erfolgt hier unter modifizierten Bedingungen:

Puffer A: 50 mmol/l MES pH 5,6

Puffer B: 50 mmol/l MES/200 mmol/l NaCl pH 5,6

Unter diesen Bedingungen kann Fab-Biotin unter hohen Ausbeuten rein erhalten werden.

#### Abkürzungen



Biotin X-OSu: N-Biotinoyl- $\alpha$ -Aminocapronsäure-hydroxysuccinimidester  
MES: 2- (N-Morpholino) ethansulfonsäure  
KPP: Kaliumpyrophosphat  
RSA: Rinderserumalbumin  
POD: Peroxidase

## Beispiel 6

### TSH Test

Die Durchführung des Tests erfolgt mit einer Mischung aus den beiden monoklonalen Antikörper gegen TSH (ECACC 87122201 und ECACC 87122202) die gem. Beispiel 5 als Fab-Biotin hergestellt wurden.

#### Schritt 1:

3  $\mu$ g Fab-Biotin-Mischung in 1 ml 50 mmol/l Phosphatpuffer pH 7,5, 0,1 % RSA, werden mit 200  $\mu$ l Probe (Humanserum aufgestockt mit TSH) für 2 Stunden in einem mit Streptavidin beschichteten Tube (Beispiel 1, siehe AFP) inkubiert. Danach wird ungebundenes Material ausgewaschen.

#### Schritt 2:

200 mU Streptavidin-POD-Konjugat in 1ml Puffer (s.o.) wird 1 Stunde inkubiert und danach ungebundenes Material ausgewaschen.

#### Schritt 3:

1 ml Substratlsg (Beispiel 1, siehe AFP) wird 1 Stunde inkubiert und die optische Dichte bei 422 nm als Mass für den TSH-Gehalt bestimmt.

FIG.1

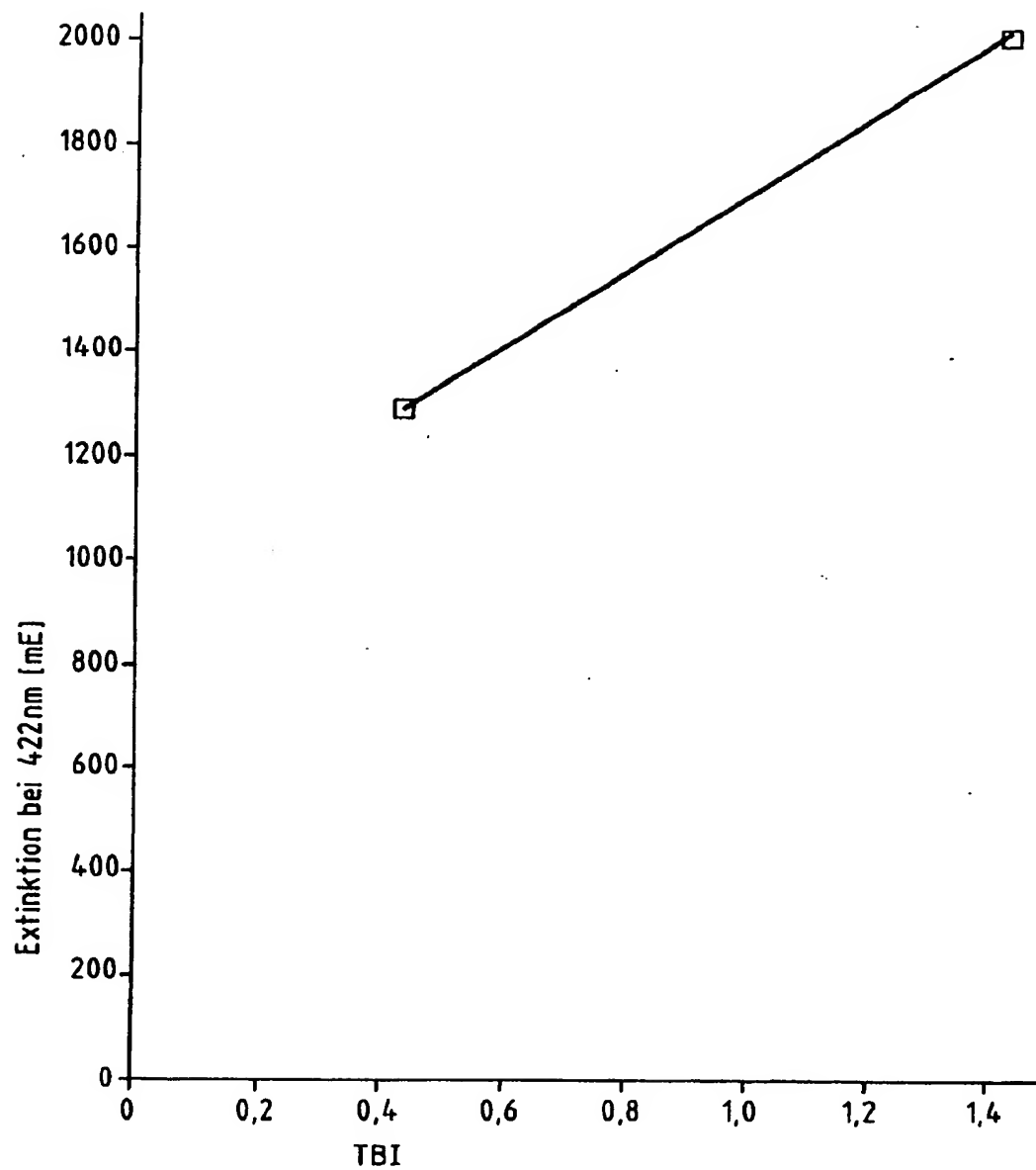
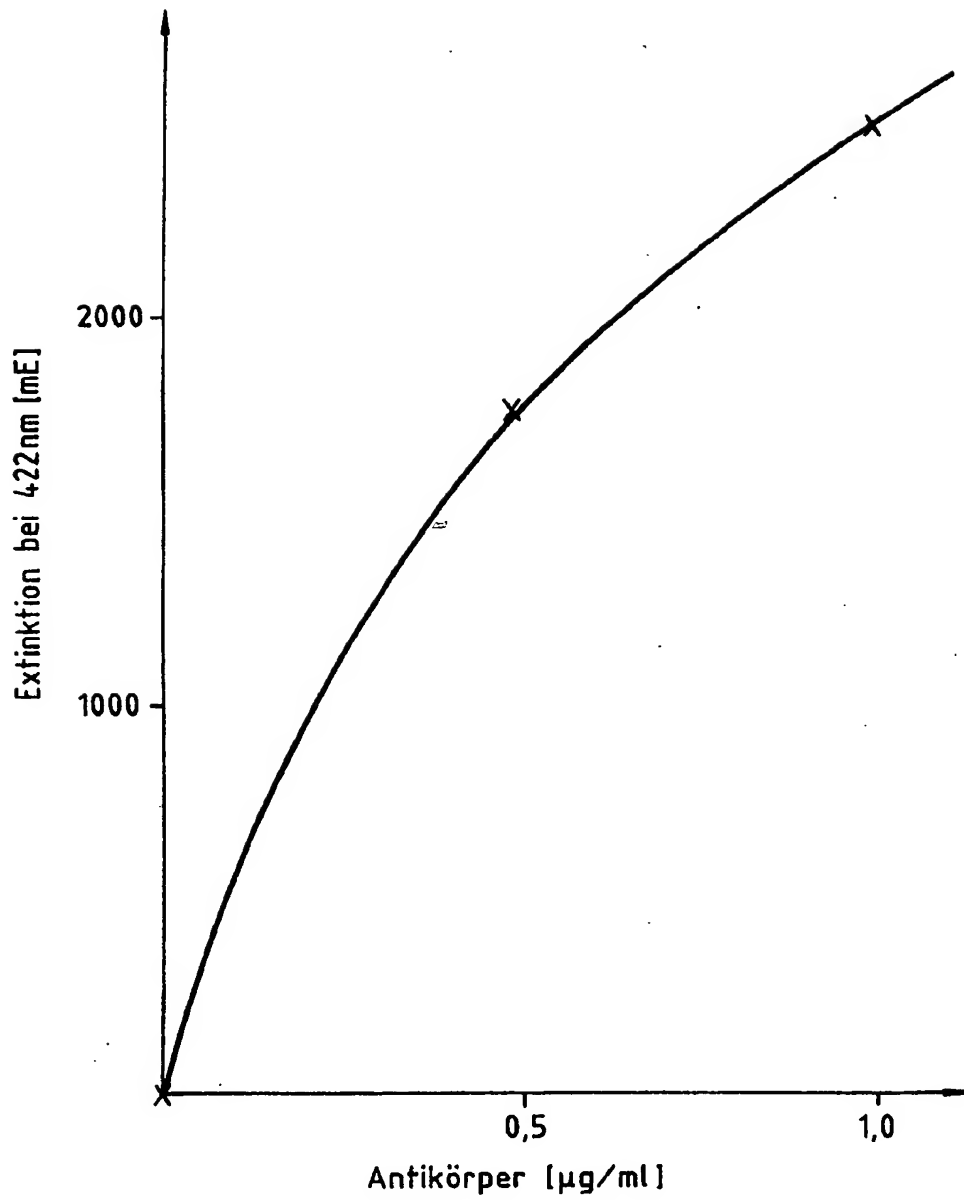


FIG.2



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2501960号

(45)発行日 平成8年(1996)5月29日

(24)登録日 平成8年(1996)3月13日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 0 1		G 0 1 N 33/543	5 0 1 D
33/53			33/53	U
33/542			33/542	Z

請求項の数10(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平3-24556

(22)出願日 平成3年(1991)2月19日

(65)公開番号 特開平4-216465

(43)公開日 平成4年(1992)8月6日

(31)優先権主張番号 P 4 0 0 6 0 5 4 . 3

(32)優先日 1990年2月26日

(33)優先権主張国 ドイツ (DE)

(73)特許権者 390009450

ベーリンガー マンハイム ゲゼルシャ  
フト ミット ベシユレンクテル ハフ  
ツング

BOEHRINGER MANNHEI  
M GESELLSCHAFT MIT  
BESCHRANKTER HAFT  
UNG

ドイツ連邦共和国 マンハイム 31 ザ  
ントホーフエルストラーセ 116

(72)発明者 アルノ デガー

ドイツ連邦共和国 ゼースハウプト フ  
ェーレンシュトラーセ 3

(74)代理人 弁理士 矢野 敏雄 (外2名)

審査官 河原 英雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リガンドを免疫学的に測定するための方法及び試薬

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 リガンドを免疫学的に測定するための方法において、測定すべきリガンドの分子1個を

a) 特異的結合能を有する物質P2の、その分子のうち少なくとも1個が標識を有する少なくとも分子2個並びに

b) P2に対して1価の結合能を有する結合成分P1と、測定すべきリガンドに対する結合部位R<sub>1</sub>とからなる受容体Rと反応させ、かつ標識を測定することを特徴とするリガンドの免疫学的測定方法。

【請求項2】 不均質相中で作業を行ない、かつこのために、固相に結合され、かつ標識化されていない分子P2を使用する請求項1記載の方法。

【請求項3】 均質相中で作業を行ない、かつ全ての分子P2を標識化された形で使用する請求項1記載の方

2

法。

【請求項4】 付加的にリガンドもしくはリガンド類似体とP1とからなる接合体Kを恒温保持の際に添加する請求項1から3までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 P1がビオチン、ハプテン又はエピトープである請求項1から4までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 P2がアビジン、ストレプトアビジン、これらのポリマー又は抗体もしくは抗体フラグメントである請求項1から5までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 R<sub>1</sub>がハプテン、エピトープ、DNA - もしくはRNA配列、又は高分子である請求項1から6までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 リガンドを免疫学的に測定するための試薬において、該試薬が、少なくとも部分的に標識化され

た形で存在する、特異的結合能を有する物質 P 2、並びに P 2 に対して 1 価の結合能を有する結合成分 P 1 と、測定すべきリガンドに対する結合部位 R<sub>1</sub> とからなる受容体 R を含有することを特徴とする、リガンドの免疫学的測定のための試薬。

【請求項 9】 該試薬が固相に結合されているか又は固相と結合可能である標識化されていない P 2 を含有する請求項 8 記載の試薬。

【請求項 10】 該試薬が付加的にリガンドもしくはリガンド類似体と P 1 とからの接合体 K を含有する請求項 8 又は 9 記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、リガンドの免疫学的な測定方法及びこれに適当な試薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 体液及び組織中には、特異な結合成分と結合可能であり、かつ特定の病気又は人体の健康状態に対するパラメータとして使用される著しく多数の物質が存在する。これらの物質には、一方では結合部位をその表面に有する免疫学的に活性のタンパク質、例えば腫瘍標識物質、ホルモン又はウィルス性タンパク質が属し、かつ他方では DNA フラグメントが属する。上記の以下「リガンド」と呼称される物質はしばしば著しく少量でのみ存在するために、該物質の検出には免疫検定の原理による方法が使用され、この場合、この方法を用いて上記物質は著しく特異的かつ正確に測定されることができる。公知の免疫学的測定方法は、均質相方法と不均質相方法とに分類される。不均質相方法の場合には、検出すべき物質及び標識化成分を含有する複合体を固定化し、かつこのことによって結合されていない成分から分離するために常に固相反応が関与している。均質相方法の場合には、結合された標識と結合されていない標識との分離は行なわれず、その結果、結合された標識と結合されていない標識との区別は別の方法によって行なわれる必要がある。

【0003】 不均質相の免疫検定は本質的に 2 つの変法、即ち競合的検定及びサンドイッチ検定を基礎とする。上記変法の場合には通常少なくとも 2 つの受容体を使用され、この場合、受容体は検出すべきリガンドと結合可能であり、かつ受容体の 1 つは標識を有し、別の 1 つは固相に結合されているか又は固相への結合を仲介する。このために多数の変法が、別の受容体の使用下で公知である。固相に結合されており、かつ標識を有する全ての複合体が測定される。

【0004】 競合的不均質相免疫検定の実施のために本質的に 2 つの変法が存在し、この場合、リガンドに対する抗体が固定化されるか又はリガンドに類似の物質が固定化される。第 1 の変法の場合には、リガンドを含有する試料溶液及びリガンドと標識とからなる接合体が固定

化された抗体と一緒に恒温保持される。この場合、リガンド及び標識化物質は抗体への結合について競合している。より多量のリガンドが溶液中に存在すればするほど、より少量の標識化物質が結合されることができる。固相と液相の分離後さらに標識は 2 相のうち 1 相中で測定することができる。結合された標識化物質の量は、測定すべき物質、即ちリガンドの量に対する間接的な尺度である。

【0005】 第 2 の変法の場合には、リガンドを含有する試料溶液が、リガンドに対して特異的な抗体及び固定化物質類似体と一緒に恒温保持される。この場合、固定化されたリガンド及び溶液中に存在するリガンドは抗体への結合について競合している。より多量のリガンドが溶液中に存在すればするほど、より少量の抗体が固定化リガンドへの結合により、同様に固相への結合によって結合される。この場合にも再度、固相を液相から分離した後に、試料溶液中のリガンドの量に再び間接的に比例している結合された標識の量が測定される。

【0006】 サンドイッチ免疫検定の変法の場合には、リガンドに対する抗体は固定化され、試料溶液は固定化された上記抗体の存在下で、リガンドと結合可能でありかつ標識化されている別の抗体と一緒に恒温保持される。この場合に受容体は過剰量で添加され、その結果、試料中に存在する、検出すべき全ての分子は固相に結合され、かつ標識化受容体と結合する。

【0007】 上記方法の欠点は、それぞれの測定すべき物質（リガンド）に対して、複数の特異的に適合する受容体が予め考慮されていなければならない点である。このようにして、リガンドごとにそれぞれ異なる、しばしば標識化された特異抗体が必要である。通常抗体分子の複数部位で攻撃する、抗体への標識群の共有結合は、このように変性された抗体の結合性性質の望ましくない変化を惹起する可能性がある。

【0008】 別の問題が、結合部位以上の数を示すタンパク質又は DNA - もしくは RNA フラグメントの検出の場合に生じる。

【0009】 この場合にはそれぞれ受容体の大多数もしくは多数は結合することができ、この場合、結合の結果として生じる不正確さは標準の使用によって尚補正されなければならない。しかしながら、全ての使用された受容体自体が他方において二価であるか又は多価である場合に、上記の不正確さは尚強められる。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】 従って本発明の課題は、リガンドが高い正確度、良好な再生可能性及び高い特異性をもって検出されることができ、かつその上普遍的に使用可能な標識化成分及び普遍的に適当な固相材料が使用されることができる方法を提供することであった。殊に、唯一の特異的に適合する受容体のみが必要とされる。

## 【0011】

【課題を解決するための手段】上記課題は、測定すべきリガンドの分子1個を

- a) 特異的結合能を有する物質P2の、その分子のうち少なくとも1個が標識を有する少なくとも分子2個並びに
- b) P2に対して1価の結合能を有する結合成分P1と、測定すべきリガンドに対する結合部位R<sub>1</sub>とからなる受容体Rと反応させ、かつ標識を測定することを特徴とするリガンドの免疫学的測定方法によって解決される。

## 【0012】

【作用】特徴a)によれば、標識化されたP2は既知の量で有利にリガンドの可能量に対する過剰量で使用され、この場合、上記過剰量は、全P2が標識化されている場合にはリガンドの化学量論的量の2倍に相応しており、また標識化されていないP2が使用されている場合には該過剰量はリガンドの化学量論的量の1倍に相応している。また、標識化されていないP2が使用されている実施態様の場合には、標識化されていないP2が1倍の過剰量で存在する。

【0013】本発明による方法は、体液もしくは組織抽出物中で検出すべき、特異的な結合能力がある全てのリガンドの測定に適当であり、この場合、低く濃縮された物質は、高く濃縮された物質と同様に良好に検出することができる。本発明による方法の感度及び正確さは、従来の公知方法と比較して改善されている。本発明は、簡単な試薬を用いて迅速かつ確実に測定を実施する可能性を提供する。

【0014】本発明による方法は、複数の結合部位を有するリガンド及びDNA - もしくはRNA分子の測定に好適である。この場合、特異的な結合部位とは、別の物質との特異的な結合を生じることができる結合部位と理解される。上記結合部位の例は、抗原決定基、タンパク質上の特異的な結合部位又はDNAもしくはRNA上の特異的な核酸配列である。

【0015】本質的な特徴は、受容体Rが、特異的な結合対P1/P2の唯一の結合成分であるP1を含有し、かつこの結合成分P1はP2に対して1価であり、その結果、受容体R1分子につき唯1分子P2のみが結合されることができることである。成分R<sub>1</sub>として、リガンドと特異的に結合可能である物質が適当である。この物質は、例えば高分子、例えば抗体、抗体フラグメント及び特異的結合能を有する結合タンパク質、ハプテン、エピトープであることができるし、DNA検出もしくはRNA検出の場合にはDNAプローブであることができる。有利に成分R<sub>1</sub>は、リガンドに対して結合部位1個のみを有する。タンパク質検出の場合には有利に、抗体結合部位1個のみを有する抗体フラグメントが使用されるか又は、タンパク質を特異的に結合させる物質、例え

ばT4を結合するタンパク質検出のためのT4が使用される。DNAもしくはRNAの検出については、成分R<sub>1</sub>として例えば、検出すべきDNAもしくはRNAの配列とハイブリッド形成することができるゾンデが使用される。特に有利に受容体R中の成分R<sub>1</sub>として、リガンドと結合可能な抗体のF a b' フラグメントが使用される。R<sub>1</sub>は、リガンドに依存して単一物質であってもよく、混合物であってもよい。

【0016】受容体Rの成分P1は、特異的な結合対の結合成分である。特異的に相互結合する対は公知である。適当な結合対は、殊にビオチン - ストレプタビジンないしはアビジン；ハプテン - 抗体、抗原 - 抗体、コンカバリン(Concavalin) - 抗体；糖 - レクチン；ハプテン - 結合タンパク質、例えばチロキシンを結合するグロブリン及びチロキシン - もしくはオリゴペプチド抗体である。

【0017】特に有利に結合対としてビオチンとストレプタビジンないしはアビジンが使用され、その結果、受容体R<sub>1</sub>は特に有利に唯1分子ビオチンを結合成分P1として含有する。

【0018】接合体は、当業者に公知の方法の使用下で得られる(例えばEur. J. Biochem. 131 (1980) 333~338と同様である)。

【0019】不均質相処理の実施の場合には、P2は標識化されていない形で固相への結合を仲介する。

【0020】本発明によれば、固相及び標識接合体は全測定に対して不変であることができ、かつ唯一受容体がそれぞれの検出すべきリガンドに一致させる必要があるだけであるため、一般的試験を提供することができる。

30 Rとリガンドと、標識化されたP2との結合が均質相中で進行するため、この結合は、不均質相中で進行する、固相、即ちP2へのRの結合と比較して有利である。従って、固相に結合された、標識化されていない、特異的に結合する系のP2は過剰量で使用される。

【0021】有利に受容体Rとして特に、抗体もしくは抗体フラグメントR<sub>1</sub>並びにP1としてのビオチンからなる接合体が使用される。

【0022】接合体R<sub>1</sub>は、自体公知の方法で、例えば抗体ないしは抗体誘導体の成分R<sub>1</sub>が結合成分P1と化学量論による比1:1で反応されることによって得られる。有利にカップリングは、遊離SH基又はアミノ基によって行なわれる。この場合に統計的に生じる、2個もしくはそれ以上の成分P1を有する生成物はゲルクロマトグラフィーによる方法によって分離することができる。特に有利に本発明による方法に対して、F a b' フラグメントとビオチンとからなる接合体R<sub>1</sub>が使用される。この種の接合体を得るために、例えば検出すべきリガンドと結合可能な抗体がペプシンで処理され、生じるF(a b')<sub>2</sub>フラグメントを還元させる条件にさらさ

50 れ、かつ引き続き成分P1と反応させられ、この場合、

成分P 1中に存在する官能基によってか又はスパーサーによって場合により結合部位の活性化後に成分P 1はF a b' フラグメントの遊離SH基もしくはアミノ基に結合する。1個もしくは複数の結合成分P 1を含有する生成物は、例えば欧州特許出願公開第0 131 343号明細書に記載の方法により分離することができ、この場合、親和性のタンパク質の電荷差異は分離に関与する。タンパク質のアミノ官能基による結合成分同士の結合の際に単結合もしくは多重結合により、その分離を可能にする異なる電荷を有する接合体が得られる。

【0023】固相として、ポリスチレン及び類似のプラスチックからなる試薬塩又は微量滴定板が好適であり、この場合、容器は吸着もしくは共有結合によって内側表面をP 2で被覆されている。さらに粒子状物質、例えばモレキュラーシーブ材料、ガラス玉、プラスチック管(Kunststoffschlaeuche)及び類似物並びに多孔性層状支持材、例えば紙もまた適当である。結合成分P 2の結合は自体公知の方法で行なわれる。

【0024】P 2の少なくとも一部分は標識化された形で使用され、均質相試験の実施の場合には全P 2が標識化された形で使用される。この場合には標識として、常用の免疫試験標識、例えば酵素、蛍光体、化学発光体もしくは放射性物質が適当である。標識の方法は、例えばClin. Chim. Acta 81 (1977) 1~40から当業者に公知であり、かつ本明細書では更に詳説はされない。標識は、自体公知の方法で測定することができる。

【0025】本発明が単相処理の実施をもって、即ち固相を使用すること無く使用される場合、全P 2は標識化された形で使用される。さらに、この際に形成される、リガンドとR少なくとも2分子と、複合体中のRの分子数に相応する分子数の標識化されているP 2とからの複合体は、単相処理の実施の場合の当業者に公知の標識測定方法で検出される。適当な検出方法は、例えば欧州特許第0084 807号明細書に記載されている。

【0026】本発明による方法の不均質相処理の場合並びに単相処理の場合に付加的に接合体Kは使用することができ、この場合、接合体は、受容体R中の結合成分P 1と同一である結合成分P 1と一緒にリガンドもしくはリガンド類似体を含む。上記処理の実施の場合には試料溶液中のリガンドは、添加された接合体K中のリガンドもしくはリガンド類似体と受容体R中の成分R<sub>i</sub>をめぐって競合し、その結果、競合的方法が生じる。上記実施態様は、固相方法の場合並びに均質相中での方法の場合に使用することができる。接合体Kを得るのに、受容体Rを得るための実施態様は同様に有効である。この場合、受容体R中の成分R<sub>i</sub>との結合能力に関してリガンドそのものと類似する性質を有する物質は、リガンド類似体と見做され、その結果、実際的に結合部位をめぐる競合が、使用された化学量論的条件下で存在する。

【0027】本発明による方法は、1工程で実施するこ

ともできるし、複数工程で実施することもできる。評価は自体公知の方法で行なわれる。各受容体及び測定すべき物質もそれぞれ特異的にのみ、各々に対して特定の反応結合成分と反応することができるため、全受容体及び試料と一緒に恒温保持することが可能であり、かつ方法を1工程で実施することが可能である。このことは、自動分析装置中で方法を実施する場合に特に有利である。方法が1工程で不均質に実施される場合には有利に、標識を有する物質P 2は受容体Rと比較して不足量で使用される。

【0028】全ての本発明による方法の変法の実施は、有利に緩衝液中で行なわれる。上記方法用の緩衝液系は、自体公知である。これには、グッドの緩衝液(GOOD - Puffer)及びホスフェート緩衝液が好適である。

【0029】本発明による方法を不均質相中で実施するために、受容体R 3個、標識化されたP 2及び場合によってはKを有する試料溶液を標識化されていないP 2で被覆された固相の存在下で同時にか又は順次に恒温保持される。この場合に、例えば受容体R 2個はリガンドに成分R<sub>i</sub>によって結合する。さらに、受容体Rの結合成分P 1によって、標識化されたP 2が結合され、かつ別の受容体Rによって結合対P 1/標識化されていないP 2によって固相への結合が行なわれる。固相に結合されており、かつ標識を有する全複合体が評価される。

【0030】本発明によれば、容易かつ迅速に実施されることができ、かつまたポリクローナル抗体の使用の場合に著しく敏感である1つの方法が提供される。

【0031】本発明のもう1つの対象は、試薬が、少なくとも一部分は標識化された形で存在する、特異的結合能を有する物質P 2及び、P 2に対して1価の結合能を有する結合成分P 1と、測定すべきリガンドに対する結合部位R<sub>i</sub>とからなる受容体Rを含有することによって特徴付けられている、リガンドの免疫学的測定のための試薬である。有利に該試薬は、標識化された形での物質P 2及び固相に結合された形として合一された糖剤(例えば試験キャリアーデバイスの層又は泥状粒子溶液)での物質P 2を含有する。

【0032】有利な実施態様により上記試薬は、標識化されていない、固相に結合されているか又は固相と結合可能なP 2を含有する。別の有利な実施態様により試薬は、既に定義された通り付加的にリガンドもしくはリガンド類似体と成分P 1とからの接合体Kを含む。上記試薬は、体液及び組織抽出物中の数多くのパラメータの測定に適当である。

【0033】有利な実施態様において試薬は付加的に緩衝剤を含有する。特に有利に該試薬はホスフェート緩衝液又はグッドの緩衝液を含有する。

【0034】図1は、チロキシン結合率の測定についての結果が描かれている線図である。

【0035】図2は、抗T 4抗体の測定についての結果

10

20

30

40

50

が描かれている線図である。

【0036】次に、本発明を図及び例につき詳説する。

【0037】

【実施例】例1

AFP ( $\alpha$ -フェトプロテイン) の測定

a) ビオチンと、抗AFP抗体のFab' フラグメントとからの接合体 (抗AFP-Fab'-ビオチン) の製造AFPに抗するポリクローナル抗体を免疫吸着により排除し、これからFab' フラグメントを得た。このFab' フラグメントをAnalyt. Biochem. 161 (1987) 262~271ないしはAnalyt. Biochem. 149 (1985) 529~536の記載によりビオチンにカップリングした。

【0038】b) 試験実施

緩衝液A:

バルビツル酸ナトリウム120mmol/l

ホスフェート緩衝液 pH8.6 18.2mmol/l  
8-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸1.27mmol/l

ウシ血清アルブミン0.2重量%

(試験における最終濃度)

緩衝液A480 $\mu$ l及び抗AFP-Fab'-ビオチン20 $\mu$ l (試験における最終濃度: 4 $\mu$ g/ml) をストレプトタビジンで被覆されたポリスチレン容器 (欧州特許出願公開第0269092号明細書により製造) 中に試料 (AFPで増加されたヒト血清) 50 $\mu$ lと一緒に注入し、かつ25℃で30分間恒温保持した。引き続き、緩衝液A480 $\mu$ l及びストレプトタビジン-POD接合体 (50mU/試験) の溶液20 $\mu$ lを添加し、かつ25℃で30分間恒温保持した。この混合物を洗浄し、かつABTS (登録商標; 以後省略) 溶液 (ABTS, 2, 2'-アジノ-ジ[3-エチルベンゾチアゾリン-スルホン酸 (6)]-ジアンモニウム塩9.1mmol/l、ホスフェート-シトレート緩衝液 pH4.4 100mmol/l、過硼酸ナトリウム3.2mmol/l) 1mlを添加し、25℃で30分間恒温保持し、かつAFP含量の尺度として光学濃度を422nmで測定した。

【0039】例2

T捕捉試験

測定を、過剰量のTBGを飽和させるためにT4を試料に添加する方法で行なった。この測定によりチロキシン結合率 (TBI) に直接比例する較正曲線が得られた。

【0040】試料: 試料として、ヒト血清中で定義された量のTBG及びT4を含有する標準液を使用した。試料1についてはTBI0.44が得られ、試料2についてはTBI1.44が得られた (ベーリンガー・マンハイム社(Boehringer Mannheim GmbH)のエンツィームン-テストの作業手引書(Arbeitsanleitung zu Enzymun-Test) TBK (登録商標)、注文No. 249416を参照の

こと)。

【0041】

試薬1

ストレプトタビジンとPODとからの接合体100U/l  
T4 36pmol/l

バルビツル酸ナトリウム120mmol/l

ホスフェート緩衝液 pH8.6 18.2mmol/l  
ウシ血清アルブミン0.2重量%

試薬2

10 T4とビオチンとからの接合体0.2nmol/l

T4に抗するポリクローナル抗体からの抗T4-Fab'-ビオチン (例1に相応して製造された) 0.15mg/l

バルビツル酸ナトリウム120mmol/l

ホスフェート緩衝液 pH8.6 18.2mmol/l  
ウシ血清アルブミン0.2重量%

試料50 $\mu$ lを試薬1 500 $\mu$ lと一緒にストレプトタビジンで被覆されたポリスチレン容器中に注入し、かつ25℃で30分間恒温保持した。この混合物に試薬2

20 500 $\mu$ lを添加し、かつ25℃で30分間恒温保持した。引き続き、水で洗浄し、かつABTS溶液 (例1を参照のこと) 1mlを添加し、25℃で30分間恒温保持し、かつチロキシン結合率の尺度として光学濃度を422nmで測定した。この結果は図1から見て取ることができる。

【0042】例3

T4に抗する抗体の測定

試料として、T4に抗するポリクローナル抗体の標準溶液を濃度0mg/l、0.5mg/l及び1.0mg/l

30 で使用した。

【0043】

試薬:

T4-ビオチン接合体10mmol/l

ストレプトタビジン-POD接合体50U/l

バルビツル酸ナトリウム120mmol/l

ホスフェート緩衝液 pH8.6 18.2mmol/l  
8-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸1.27mmol/l

ウシ血清アルブミン0.2重量%

40 試料50 $\mu$ lを試薬1mlと一緒にストレプトタビジンで被覆されたポリスチレン容器中で25℃で30分間恒温保持した。引き続き、洗浄し、かつABTS溶液 (例1を参照のこと) 1mlを添加し、25℃で30分間恒温保持し、かつT4に抗する抗体の含量の尺度として光学濃度を422nmで測定した。この結果は図2から見て取ることができる。

【0044】例4

IgG-ビオチン (1:1) の製造

1) TSH (ECACC 87122202) に抗するモノクローナル抗体50mgを2倍モル過剰量のD-ビオチ



ニル- $\epsilon$ -アミドカブロン酸-N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステルと JACS 100 (1978)、3585~3590により反応させた。主要生成物としてモノビオチニル化 IgG's 及び分離される高ビオチニル化副生成物が得られる。

#### 【0045】

2) 分離は、例えば欧州特許出願公開第0131343号明細書に記載され

ているDIPクロマトグラフィー ( $\Delta$ -等電点(Delta-Isoelectric-Point))を用いて行なった。

【0046】混合物の分離は、モノ-Sカチオン交換カラム(Mono-S Kationenaustauschersaeule) (ファルマシア社(Pharmacia))で行なった。

【0047】混合物をカリウムピロホスフェート緩衝液 1mmol/l、pH6.9 (緩衝液A)中に供給した。結合された成分を線状勾配の接触によってカリウム

緩衝液A: MES 50mmol/l、pH5.6

緩衝液B: MES 50mmol/l / NaCl 200mmol/l、pH5.6

上記条件下で、Fab-ビオチンを高い収率下で純粋に得ることができた。

#### 【0051】

略称

ビオチン X-OSu:

N-ビオチニル- $\epsilon$ -アミノカブロン酸-ヒドロキシスクシンイミドエステル

MES: 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸

KPP: カリウムピロホスフェート

RSA: ウシ血清アルブミン

POD: ペルオキシダーゼ

例6

TSH試験

試験を、例5によりFab-ビオチンとして得られた、TSHに抗する2つのモノクローナル抗体 (ECACC 87122201及びECACC 87122202)からの混合物を用いて実施した。

#### 【0052】

工程1:

ホスフェート緩衝液 50mmol/l、pH7.5、1

ピロホスフェート緩衝液 20mmol/l / NaCl 200mmol/l、pH6.9 (緩衝液B)で溶離した。純粋なモノビオチニル化 IgG画分が高い収率で、より高いビオチニル化度を有するプールとともに得られた。

#### 【0048】例5

Fab-ビオチン (1:1) の製造

1) TSH (ECACC 87122202) に抗するモノクローナル抗体を、ジョンストン(A. Johnstone)、ソー

10 プ(R. Thorpe)著; Immunochimistry in Practice, Blackwell Scientific Publications (1982)、52~53によりFabに分解した。

【0049】Fab 50mgを、例4に記載された通りに反応させた。

#### 【0050】

2) 分解は、本例では変更された条件下で行なった:

20 ml中のFab-ビオチン混合物 3 $\mu$ g、RSA 0.1%を試料 (TSHで増加されたヒト血清) 200 $\mu$ lと一緒にストレプトタビジンで被覆された容器 (例1、AFPを参照のこと) 中で2時間恒温保持した。その後、結合されていない材料を洗い落した。

#### 【0053】

工程2:

緩衝液 (上記参照のこと) 1ml中のストレプトタビジン-POD-接合体 200mUを1時間恒温保持し、かつその後に結合されていない材料を洗い落した。

30 【0054】

工程3:

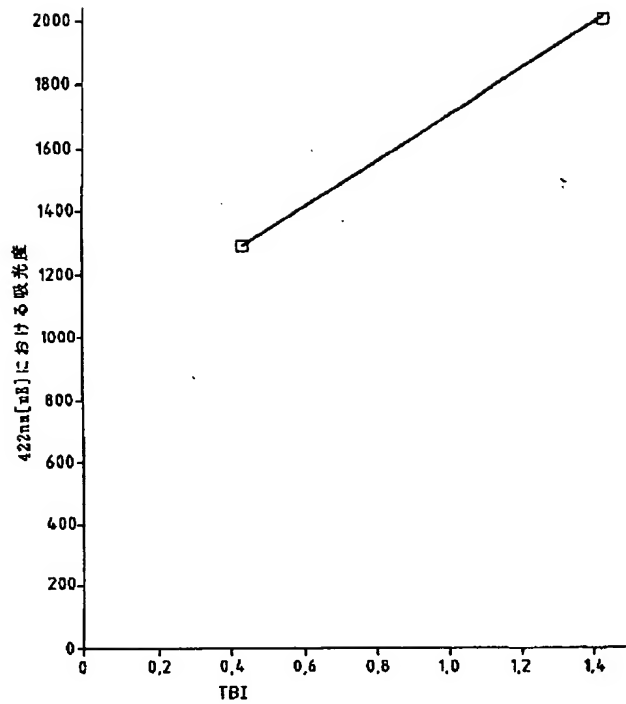
基質溶液 (例1、AFPを参照のこと) 1mlを1時間恒温保持し、かつTSH含量の尺度として光学濃度を422nmで測定した。

#### 【図面の簡単な説明】

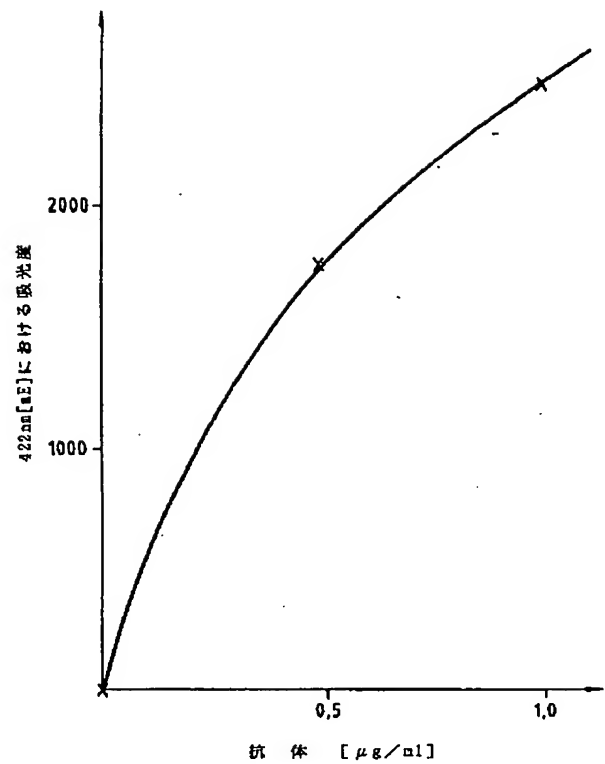
【図1】チロキシン結合率の測定についての結果が描かれている線図である。

【図2】抗T4抗体の測定についての結果が描かれている線図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 ローラント シェンク  
ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム ペ  
レンミュールヴェーク 64

(72)発明者 ゲルハルト ビーンハウス  
ドイツ連邦共和国 ハウンスホーフェン  
カルヴェンデルシュトラッセ 1

(56)参考文献 特開 昭60-252265 (J P, A)  
特開 昭55-10590 (J P, A)  
国際公開88/5538 (WO, A)